

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-018769
(43)Date of publication of application : 26.01.1999

(51)Int.CI. C12N 15/09

(21)Application number : 09-175896 (71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO
(22)Date of filing : 01.07.1997 (72)Inventor : HAYASHIZAKI YOSHIHIDE
NISHI KATSUO
SENOO KATSUMI
KITSUNAI TOKUJI
KUKIZAKI SHIGENARI

(54) METHOD AND SYSTEM FOR PREPARING DNA AND RNA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a preparation method and a system for DNA or RNA enabling the automatic high speed preparations of samples of plasmid DNA, microorganisms and higher organisms, nucleus DNA, etc.

SOLUTION: In a preparation method in which DNA or RNA is prepared via plural processes, the time for one step is set at the minimum effective time in the plural processes, and processes needing longer times are divided so that they are carried out in plural steps, and the samples to be processed are moved for every step via plural processes. This system enables the supply and recovery of sample plates at the minimum effective time, and the extreme increase of a processing capacity per unit time.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.03.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-18769

(43)公開日 平成11年(1999)1月26日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09

識別記号

F I
C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平9-175896

(22)出願日 平成9年(1997)7月1日

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72)発明者 林崎 良英

茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内

(72)発明者 西 克夫

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

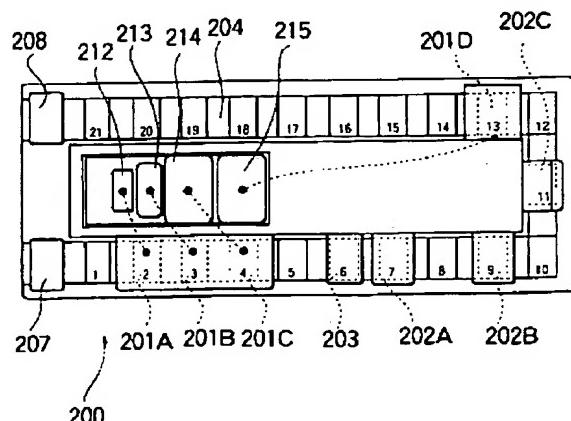
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNAまたはRNA調製方法およびシステム

(57)【要約】

【解決手段】 DNAまたはRNAを複数の工程を経て調製するDNAまたはRNA調製方法において、前記複数の処理工程の内で有効最小時間に1ステップでの時間を設定し、複数の処理工程のうちより長い時間を要する処理工程は、その時間を分割し、複数のステップで行い、処理すべき試料を複数の処理工程を経て、1ステップ毎に移動していくようとする。

【効果】 有効最小時間で試料プレートを装置に供給し、回収でき、単位時間当たりの処理能力を著しく高めることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 DNAまたはRNAを複数の工程を経て調製するDNAまたはRNA調製方法において、前記複数の処理工程の内で有効最小時間に1ステップでの時間を設定し、前記複数の処理工程のうちより長い時間を要する処理工程は、その時間を分割し、複数のステップで行い、処理すべき試料を前記複数の処理工程を経て、1ステップ毎に移動していくことを特徴とするDNAまたはRNA調製方法。

【請求項2】 前記複数の処理工程は、細胞溶解工程、DNAまたはRNA吸着工程、溶液吸引ろ過工程、洗浄工程およびDNAまたはRNA回収工程を含み、1ステップの処理時間を、前記複数の処理工程の有効最小時間に設定した請求項1記載のDNAまたはRNA調製方法。

【請求項3】 DNAまたはRNAを複数の処理工程を経て調製するDNAまたはRNA調製システムにおいて、前記複数の処理工程の各々を行うために順次配設された複数の処理ステーションと、該処理ステーションを順次通して、処理すべき試料プレートを1ステップ毎に移動させていくための試料プレート移動手段とを備えており、前記1ステップでの処理時間は、前記複数の処理工程の有効最小時間に設定されており、前記複数の処理工程のうちのより長い時間を要する処理工程を行う処理ステーションは、複数のステップでその処理を行うように分割して設けられていることを特徴とするDNAまたはRNA調製システム。

【請求項4】 前記試料プレートは、同一プレートにて前記複数の処理工程のすべてを行えるものである請求項3記載のDNAまたはRNA調製システム。

【請求項5】 前記試料プレートは、処理すべき試料を保持する複数の穴をマトリクス状に設けた平板状プレートからなり、前記各穴の底面側には、吸引口が形成され、該穴の底部には、前記吸引口の手前において担体とそれを保持する構造が設けられている請求項4記載のDNAまたはRNA調製システム。

【請求項6】 前記複数の処理ステーションのうち最初の処理ステーションへ試料プレートを自動的に供給するための自動試料供給手段と、前記複数の処理ステーションのうちの最後の処理ステーションから試料プレートを回収して収納するための自動試料収納手段とをさらに備える請求項3または4または5記載のDNAまたはRNA調製システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自動的に高速度にてプラスミドDNA及び微生物、高等生物の核DNAまたはRNA等を調製する方法およびシステムに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 プラスミドに代表されるDNA、RNAは、特定の遺伝子を組み込むことにより、細菌のタンパク質合成の場を利用して大量にタンパク質を得ることなどを可能とするものであり、プラスミドDNAは、DNAシーケンシングにおいて大量に必要とされるものである。従来、このような用途を有するプラスミドの調製方法としては種々あるが、代表的な従来方法によれば、大腸菌の如き微生物菌体にプラスミドを導入しておき、この微生物菌体を培養し、培養によって増やした微生物菌体からプラスミドを抽出する。微生物菌体からプラスミドを抽出するには、微生物菌体を培養した培養液に溶菌用溶液を添加して溶菌を行い、この溶菌により溶液中に溶出されたプラスミドを溶液から分離して回収する。

【0003】 このような調製方法を実施する従来のプラスミドDNA調製装置としては、減圧式ダブルフィルトレーション方式による精製を行うものが開発され市販されている。この従来の装置においては、集菌工程、溶菌工程、アルカリSDS処理工程、中和徐タンパク処理工程、減圧ろ過工程、DNA吸着工程、洗浄工程およびDNA溶出工程を一台の装置において、バッチ式に順次行うようしている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 このような従来のバッチ式の装置では、前述したような各工程を一台の装置の中で順次行っていかなければならず、すなわち、前の処理工程が完了した後でなければ次の処理工程へとは移行できないものであった。したがって、その全体の処理速度は、前述した各処理工程のうち、最も時間を要する処理工程によって大きく左右されてしまうものであった。

【0005】 したがって、従来のバッチ式のプラスミドDNAまたはRNA精製装置では、例えば、48検体の試料を処理するのに2時間程も要していました。1日約17時間稼働とすれば、一台の装置で約400の試料しか処理できない。1日の処理量を増大するためには、1日の稼働時間を長くすることが考えられるが、これには限度がある。一方、装置の使用台数を増大することも考えられるが、それだけ設備費がかさむだけでなく、装置に対する作業量が、使用する台数分だけ増大することになり、それだけコスト高となってしまう。

【0006】 本発明の目的は、前述したような従来の技術の問題点を解消し、自動的に高速度にてプラスミドDNA及び微生物、高等生物及び核DNA等の試料を調製することができるようとするDNAまたはRNA調製方法およびシステムを提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明の一つの特徴によれば、DNAまたはRNAを複数の工程を経て調製するDNAまたはRNA調製方法において、前記複数の処理工程の内で有効最小時間に1ステップでの時間を設定し、前記複数の処理工程のうちより長い時間を要する処

理工程は、その時間を分割し、複数のステップで行い、処理すべき試料を前記複数の処理工程を経て、1ステップ毎に移動していくようとする。

【0008】本発明の別の特徴によれば、DNAまたはRNAを複数の処理工程を経て調製するDNAまたはRNA調製システムにおいて、前記複数の処理工程の各々を行うために順次配設された複数の処理ステーションと、該処理ステーションを順次通して、処理すべき試料プレートを1ステップ毎に移動させていくための試料プレート移動手段とを備えており、前記1ステップでの処理時間は、前記複数の処理工程の有効最小時間に設定されており、前記複数の処理工程のうちのより長い時間を要する処理工程を行う処理ステーションは、複数のステップでその処理を行うように分割して設けられている。

【0009】本発明の一つの実施の形態によれば、前記複数の処理工程は、細胞溶解工程、DNA吸着工程、溶液吸引ろ過工程、洗浄工程およびDNA回収工程を含み、1ステップの処理時間を、前記複数の処理工程の有効最小時間に設定する。

【0010】本発明の一つの実施例によれば、前記試料プレートは、同一プレートにて前記複数の処理工程のすべてを行えるものである。この一実施例の試料プレートは、処理すべき試料を保持する複数の穴をマトリクス状に設けた平板状プレートからなり、前記各穴の底面側には、吸引口が形成され、該穴の底部には、前記吸引口の手前において担体とそれを保持する構造が設けられている。担体としては、ガラスフィルター、ガラスピーブ、ガラス粉末、シリコンビーズ、イオン交換樹脂、ハイドロキシアバタイト、セライトから選ぶことができる。

【0011】本発明の別の実施例によれば、DNAまたはRNA調製システムは、さらに、前記複数の処理ステーションのうち最初の処理ステーションへ試料プレートを自動的に供給するための自動試料供給手段と、前記複数の処理ステーションのうちの最後の処理ステーションから試料プレートを回収して収納するための自動試料収納手段とを備える。

【0012】

【発明の実施の形態】次に、添付図面に基づいて、本発明の実施例について、本発明をより詳細に説明する。

【0013】図1は、本発明によるDNA調製システムの一実施例の構成の概要を示すブロック図である。この図1のブロック図に示されるように、この実施例のDNA調製システムは、主として、調製装置へ処理すべき微生物菌体を含む培養液の如き試料を担持したタイタープレートの如き試料プレートを自動的に供給するための自動試料供給装置100と、この自動試料供給装置100から自動的に供給される試料プレートを受け入れて各処理工程を行う調製装置200と、各処理工程が完了した後に調製装置200から試料プレートを自動的に回収して収納するための自動試料収納装置300とを備えてい

る。

【0014】調製装置200は、細胞溶解されたプラスミドDNAまたは微生物、高等生物の核DNAをガラス担体に吸着し、ガラス担体に吸着したプラスミドDNAを自動回収するものである。この調製装置200は、主として、試料担体を受け入れるプラスミド挿入工程を行う処理ステーション210と、ガラス担体の存在下、微生物菌体に細胞溶解用溶液及びDNA吸着用溶液を順次添加してその状態を放置して反応を進めガラス担体にプラスミドDNAまたは微生物、高等生物の核DNAを吸着させる細胞溶解工程およびDNA吸着工程を行う処理ステーション220および230と、添加した溶液をガラス担体から分離するために吸引ろ過する溶液吸引ろ過工程を行う処理ステーション240と、溶液吸引ろ過後に残留溶液を洗浄する洗浄工程を行う処理ステーション250と、ガラス担体に吸着したプラスミドDNAをDNA溶出用溶液で溶出させて回収するDNA回収工程を行う処理ステーション260とを備えている。

【0015】図2は、このDNA調製システムにおいて使用される試料プレートの一例としての、マイクロタイタープレートの概略斜視図である。図2に示されるように、このマイクロタイタープレート10は、平板状プレートに12行×8列に96個の穴（ウェル）11が形成されている。図3は、これら穴11のうちの一つの横断面形状を示している。この図3によく示されるように、穴11の底面側には、吸引口12が形成されており、穴11の底部には、吸引口12の手前において、ガラスフィルタ13と、メンブレンフィルタ14とが重ね合わせて設けられている。このマイクロタイタープレート10は、後述するように、処理すべき試料である微生物菌体を含む培養液1を各穴11内へ入れた状態にて自動試料供給装置100により調製装置200へと自動的に供給され、調製装置200により各処理ステーション210から260へと移動させられていく間に所定の処理を受けて、すべての処理の完了後、調製装置200から自動試料収納装置300へと送られ回収収納されていくものである。

【0016】マイクロタイタープレート10の各々には、それぞれを識別できるようなバーコード等の識別符号を付しておくとよい。こうすることにより、異常状態および異常菌体（吸引不良等）を含むタイタープレートの認識を行え、それらデータを記録装置に保存しており、何時でもそのデータをモニタ画面表示できるようになることが可能となる。

【0017】図4は、調製装置200を示す概略正面図であり、図5は、その概略平面図である。図5によく示されるように、調製装置200は、本体ハウジングの上面にそってほぼU字型にタイタープレート10を自動的に移動させていくための移動ライン機構であるプレート搬送部204（この移動ライン機構自体は、通常よく知

られた自動工業ライン機構と同様のものでよいので、ここでは詳述しない)を備えている。この本体ハウジングの上面のU字型の移動ラインにそって、前述したような処理ステーション210、220、230、240および250が配列して設けられており、処理ステーション260は、自動試料収納装置300の前段あるいは後段に設置することができる。

【0018】図5によく示されるように、この実施例の調製装置200では、試料挿入工程を行う処理ステーション210は、ステーション(場所)1のみからなり、細胞溶解工程およびDNA吸着工程を行う処理ステーション220および230は、3つのステーション2、3および4に分割されている。また、溶液吸引ろ過工程を行う処理ステーション240は、2つのステーション5および6に分割されている。処理ステーション250は、洗浄工程を行う6つのステーション7、8、9、10、11および12に分割され、さらにまた、洗浄および乾燥を行う8つのステーション13、14、15、16、17、18、19および20に分割されている。また、DNA回収工程を行う処理ステーション260として、TE緩衝液注入工程を行うステーション21を設置することもできる。

【0019】図4および図5に示されるように、調製装置200の本体ハウジングの上方において、ステーション2に対応する位置には、溶液1をマイクロタイターブレート10の各穴11内へ注入するための96チャンネルの精密分注器201Aが配置されており、ステーション3に対応する位置には、溶液2をマイクロタイターブレート10の各穴11内へ注入するための96チャンネルの精密分注器201Bが配置されており、ステーション4に対応する位置には、溶液3をマイクロタイターブレート10の各穴11内へ注入するための96チャンネルの精密分注器201Cが配置されている。

【0020】また、ステーション6に対応する位置には、残液検出機203が配置されている。さらにまた、ステーション7、9および11に対応する位置には、それぞれ80%エタノール液を注入するための96チャンネルのエタノール注入器202A、202B、202Cが配置されている。ステーション13に対応する位置には、80%エタノール+20%グリセノール液を注入するための96チャンネルの精密分注器201Dが配置されている。ステーション21に対応する位置には、TE緩衝液を注入するための分注器が配置されるのが、この実施例の装置では、DNA回収は自動試料収納装置の後段にて行うので、TE緩衝液の注入器は、図示していない。

【0021】さらにまた、この調製装置200には、本体ハウジングの上部には、プレート搬送部204の入口側に、プレート分離機構207が配置され、プレート搬送部204に出口側に、プレート積み上げ機構208が

配置されている。また、本体ハウジングの前面側には、操作パネル205および減圧設定表示パネル206が設けられている。本体ハウジングの下方内側には、吸引タンク209が配置され、且つ、80%エタノール液のタンク211が配置されている。本体ハウジングの上部には、溶液1のタンク212、溶液2のタンク213、溶液3のタンク214、80バーセントエタノール+20%グリセノール液のタンク215が配置されている。

【0022】ここで、本実施例における使用溶液について説明しておく。溶液1は、50mM グルコース、25mM トリス塩酸バッファ液(pH8.0)、10mM EDTA(pH8.0)であり、溶液2は、0.2N 水酸化ナトリウム、1% SDSであり、溶液3は、0.7酢酸カリウム(pH4.8)、5.3 グアニジン塩酸塩である。TE緩衝液は、10mM トリス塩酸バッファ液(pH8.0)、1mMEDTAである。

【0023】図6は、自動試料供給装置100または自動試料収納装置300として使用される自動スタッカ装置の概略平面図であり、図7は、その概略正面図である。この自動スタッカ装置400は、自立式で固定装置付キャスターにより移動可能なものとされており、プレート収納受渡部401と、プレート搬送収納部402と、透明カバー403と、プレート搬送板404と、プレート供給受渡部405と、コネクター406と、調製装置200との結合部407とを備えている。

【0024】この自動スタッカ装置が供給スタッカ装置(自動試料供給装置)100として使用されるときは、調製装置200に供給する試料(タイターブレート)を保管する装置であり、この実施例では、1台で216枚のタイターブレート10の収容能力を有し、且つ、本体シーケンサからの指示により、プレートセット(12枚)を調製装置200に導入、供給でき(プレート分離機構207へ供給)、調製装置200の動作と協調的に運転されると共に、調製装置200に対して着脱可能なものである。

【0025】この自動スタッカ装置400が排出スタッカ装置(自動試料収納装置)300として使用されるときには、調製装置200で処理された試料(タイターブレート)を順次搬出収納する装置であり、1台で216枚以上の試料を収納することができ、本体シーケンサからの指示により、本体シーケンサからの指示により、調製装置200から積み上げられた試料を取り(プレート積み上げ機構208から受領)、スタッカに収納でき、調製装置200の動作と協調的に運転されると共に、調製装置200に対して着脱可能なものである。

【0026】次に、調製装置200における処理動作について、特に、図5の調製装置200の概略平面図および図8のDNA調製工程タイムチャートを参照して、説明する。前述したように、調製装置200は、この実施例では、21個所のステーション(場所)1~21から

なるライン204を有し、各ステーションでは、下記の
処理を行う。

ステーション(場所)	処理
1	試料タイタープレート受領
2	溶液1 注入
3	溶液2 注入
4	溶液3-GuHC1 注入
5	吸引・ろ過
6	吸引・ろ過、ウェル内液面検出
7	80%エタノール 注入+吸引・ろ過
8	吸引・ろ過
9	80%エタノール 注入+吸引・ろ過
10	吸引・ろ過
11	80%エタノール 注入+吸引・ろ過
12	吸引・ろ過
13	80%エタノール+20%グリセロール 注入
14~20	吸引・ろ過
21	空(TE緩衝液 注入の場合がある)

【0028】この実施例では、図8のタイムチャートの横欄の時間T(分)および縦欄の場所(ステーション)番号に示されるように、ライン204が各ステーションで停止している時間は、標準2.5分とし、これに対し、0.2から3倍程度の時間に調整可能とする。

【0029】なお、前述した実施例の説明では、各ステーションでの所要時間を2.5分に設定したのであるが、本発明は、これに限定されず、必要な複数の処理工程のそれぞれに要する処理時間のうちの有効最小時間を考慮して、任意の時間に設定することができるものである。

【0030】

【発明の効果】本発明は、それぞれの処理工程内容により、長時間処理工程ではその処理作業をいくつかのステップに分割し、これらステップを通して試料プレートを移動していく試料プレート移動型としたので、有効最小時間で試料プレートを装置に供給し、回収でき、単位時間当たりの処理能力を著しく高めることができる。

【0031】試料プレートに対する各処理を行う調製装置に対して、試料プレートを自動的に供給、回収できるようにする自動スタッカを着脱自在なものとすることにより、試料プレートへの試料の分注等の準備を別の場所でも行えるので、操作員の作業もより効率的に行える。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるDNA調製システムの一実施例の構成の概要を示すブロック図である。

【図2】DNA調製システムにおいて使用される試料プレートの一例としての、マイクロタイタープレートの概略斜視図である。

【図3】図2の試料プレートの穴のうちの一つの横断面形状を示す図である。

【図4】本発明の一実施例としての調製装置を示す概略正面図である。

* 【0027】

【図5】図4の調製装置の概略平面図である。
20 【図6】自動試料供給装置または自動試料収納装置として使用される自動スタッカ装置の概略平面図である。

【図7】図6の自動スタッカ装置の概略正面図である。
【図8】本発明の一実施例としてDNA調製システムにおけるDNA調製工程タイムチャートを示す図である。

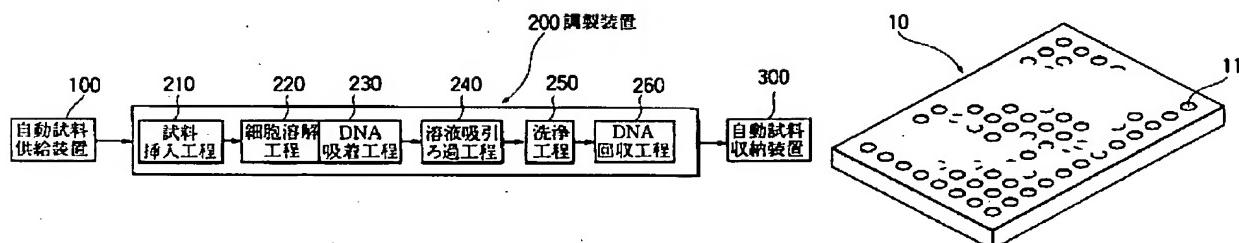
【符号の説明】

- 1 培養液
- 10 マイクロタイタープレート
- 11 穴
- 12 吸引口
- 30 13 ガラスフィルタ
- 14 メンブレンフィルタ
- 100 自動試料供給装置
- 200 調製装置
- 201A 精密分注器
- 201B 精密分注器
- 201C 精密分注器
- 201D 精密分注器
- 202A エタノール分注器
- 202B エタノール分注器
- 40 202C エタノール分注器
- 203 残液検出器
- 204 プレート搬送部
- 205 操作パネル
- 206 減圧設定表示パネル
- 207 プレート分離機構
- 208 プレート積み上げ機構
- 209 吸引タンク
- 211 エタノールタンク
- 212 溶液タンク
- 50 213 溶液タンク

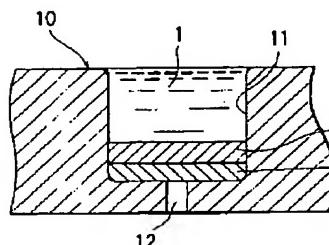
214 液タンク
 215 液タンク
 210 試料挿入工程処理ステーション
 220 溶菌工程処理ステーション
 230 DNA吸着工程処理ステーション
 240 DNA吸着工程処理ステーション
 250 洗浄工程処理ステーション
 260 DNA回収工程処理ステーション
 230 DNA吸着工程処理ステーション

* 240 液吸引ろ過工程処理ステーション
 250 洗浄工程処理ステーション
 260 DNA回収工程処理ステーション
 400 自動スタッカ装置
 *

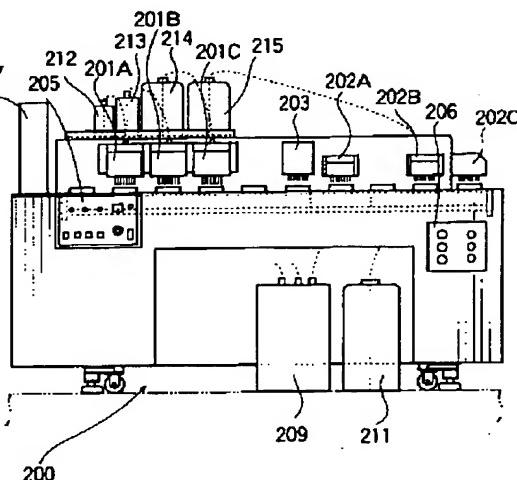
【図1】



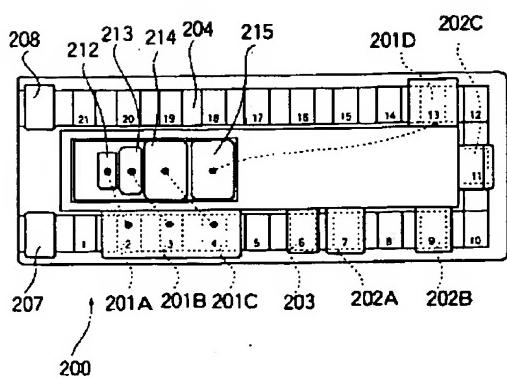
【図3】



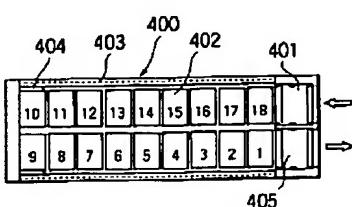
【図4】



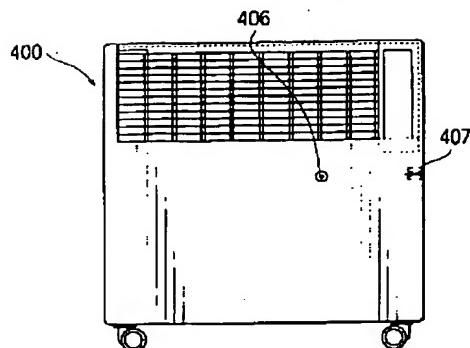
【図5】



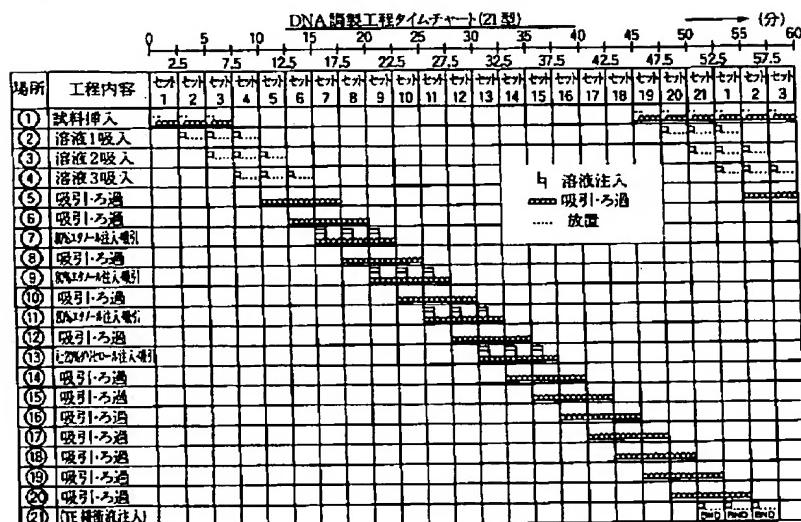
【図6】



〔図7〕



〔図8〕



フロントページの続き

(72)発明者 妹尾 克己
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72)発明者 橘内 徳司
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72)発明者 久木崎 重成
埼玉県所沢市荒幡1001 株式会社ライフテ
ック内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.